

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Yana Trubitsyna

Regulátory TORC1 aktivity u kvasinek
TORC1 pathway regulators in yeast cells

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.05.2017

Podpis

Poděkování:

Děkuji prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za trpělivost a čas, který mi věnovala po dobu psaní této bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala RNDr. Libuši Váchové, CSc. a RNDr. Michaelae Schierové, Ph.D za cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat svým přátelům a rodině za podporu během studia a psaní této práce.

Obsah

Seznam často používaných zkratk	1
ABSTRACT	2
1 Úvod	3
2 Regulace TORC1	5
2.1 EGO komplex („escape from growth arrest“)	5
2.2 Lst4p a Lst7p proteiny	8
2.3 Vam6p	9
2.4 Zdroje dusíku	10
2.5 LeuRS (Leucyl-tRNA syntetáza)	12
2.6 tRNA (Transfer RNA)	14
2.7 V-ATPáza	15
2.8 SEA komplex a GATOR komplex	16
2.8.1 SEA komplex („Seh1-associated complex“)	16
2.8.2 SEACIT („SEA complex inhibiting TORC1“)	17
2.8.3 SEACAT („SEA complex activating TORC“)	18
2.8.4 GATOR („GAP Activity Towards Rags“)	18
2.9 Lam2p	18
3 Závěr	19
4 Literatura	20

Seznam často používaných zkratk

TOR	The target of rapamycin	cíl rapamycinu
TORC1	TOR complex 1	TOR komplex 1
mTORC1	mammalian TOR complex 1	savčí TOR komplex 1
EGO	escape from growth arrest	únik ze zastavení růstu
GAP	GTPase-activating protein	Protein aktivující GTPázu
GEF	Guanine nucleotide exchange factor	Protein provádějící výměnu GDP za GTP
SEAC	Seh1-associated complex	Komplex asociovaný s Seh1 proteinem
SEACIT	SEA complex inhibiting TORC1	SEA komplex inhibující TORC1
SEACAT	SEA complex activating TORC1.	SEA komplex aktivující TORC1
GATOR	GAP Activity Towards Rags	GAP protein pro Rag proteiny

ABSTRAKT

TORC1 („Target Of Rapamycin“) je vysoce konzervovaná serin-threoninová kináza, která se podílí na regulaci růstu, metabolismu, apoptózy a proliferace. Řada regulátorů a mechanismů regulace TORC1 jsou konzervovány v různých eukaryotických buňkách. TORC1 v kvasinkových buňkách je homologem mTORC1 („mammalian Target Of Rapamycin“) v savčích buňkách. Správná regulace aktivity TORC1 je nutná pro správné fungování organismů, proto jsou TORC1 a jeho regulátory předmětem mnoha výzkumů. I mutace jednotlivých proteinů, které jsou součástí regulačních komplexů ovlivňujících TORC1 aktivitu může vést k nenapravitelným poškozením buněk a organismů. Tato práce má za cíl popsat regulátory TORC1 u kvasinek a ve vybraných případech porovnat mechanismy regulace TORC1 u kvasinek a mTORC1 u savčích buněk. Tato práce též zahrnuje informace o některých regulačních mechanismech mTORC1 které zatím u kvasinek nebyly popsány.

Klíčová slova – TORC1, mTORC1, regulace, aktivita, kvasinky

ABSTRACT

TORC1 („Target Of Rapamycin“) is highly conserved serine-threonine kinase that regulates cell growth, metabolism, proliferation and apoptosis. Some of the regulators and mechanisms of regulation of TORC1 activity are conserved in different eukaryotic organisms. In mammalian cells mTORC1 („mammalian Target Of Rapamycin“) is present that is homologous to yeast TORC1. The correct regulation of TORC1 activity is required for vitality of organisms and thus TORC1 and its regulations are investigated by many researches. A mutation in a single protein that is a part of TORC1 regulating complexes may result in a serious damage to the cell and to the organism. This thesis aims to describe the known TORC1 regulators in yeast and, in some cases, to compare TORC1 and mTORC1 regulations. Information on mTORC1 regulations that have not yet been identified in budding yeasts is also included.

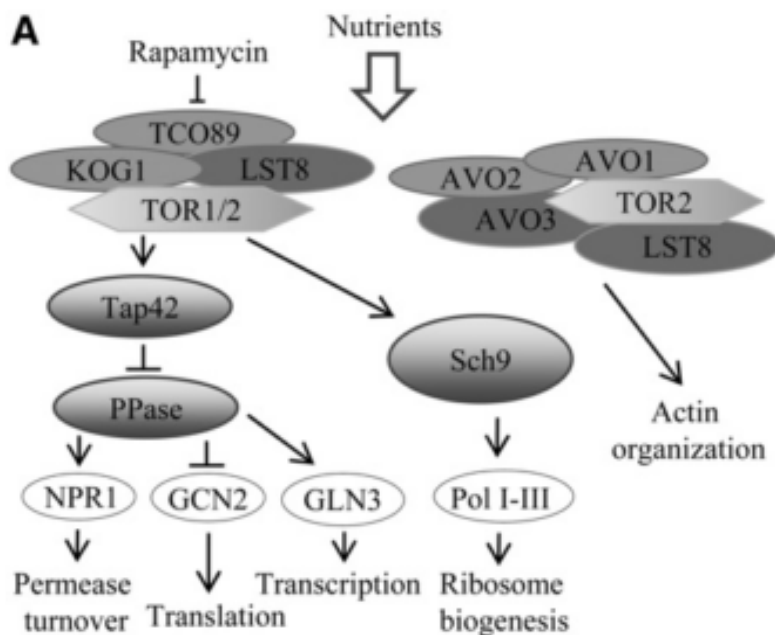
Keywords – TORC1, mTORC1, regulation, activity, yeast

1 Úvod.

Cílem této práce je shrnout známé mechanismy regulace aktivity TOR komplexu 1 u kvasinek. Ve vybraných případech budou v této práci zmíněny i analogie a rozdíly ve stavbě a regulaci mTORC1 savčích buněk.

TOR („Target Of Rapamycin“) komplex 1 je vysoce konzervována struktura, která se vyskytuje jak u nižších tak u vyšších eukaryot včetně člověka. Rovněž některé mechanismy regulace jsou konzervovány. V buňkách kvasinek se TOR komplex 1 (TORC1), skládá z proteinů Tor1p(TORC1-A) nebo Tor2p(TORC1-B), LST8p, KOG1p a TCO89p (Heitman, Movva, & Hall, 1991; Loewith et al., 2002). TOR2 a LST8 proteiny jsou rovněž součástí TOR komplexu 2, který obsahuje dále proteiny AVO1p, AVO2p, AVO3p (Loewith et al., 2002) a který má funkce zcela odlišné od komplexu TORC1. V buňkách vyšších eukaryot se vyskytuje mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin), který je strukturou homologickou kvasinkovému TORC1. mTOR komplex 1 obsahuje proteiny mTOR, Raptorp („regulatory associated protein of mTOR“ (Hara et al., 2002), mLST8p („mammalian lethal with sec13 protein 8“), PRAS40p („proline-rich Akt substrate of 40 kDa“), a Deptorp (Peterson et al., 2009). Raptor je orthologem kvasinkového Kog1p, Lst8p protein je orthologem mLST8p (Hara et al., 2002; Loewith et al., 2002).

TORC1 je vysoce konzervována serin-threoninová kináza. (Heitman et al., 1991), která se uplatňuje (pozitivně nebo negativně) v regulacích procesů růstu buněk, proteosyntézy, metabolismu a autofagie. Svými regulátory může být TORC1 aktivován nebo potlačen v závislosti na přítomnosti živin, a to hlavně aminokyselin jako zdroje dusíku. Kvasinkový TORC1 je lokalizován na membráně vakuol a tato lokalizace není závislá na přítomnosti živin (Binda et al., 2009). Naproti tomu je lokalizace mTORC1 na lysosomální membráně regulována dostupností živin, konkrétně aminokyselin (Sancak et al., 2008).



Obrázek 1. signalizace TORC1 a TORC2. TOR komplex 1 se skládá z TCO89p, KOG1p, LST8p a TOR1p nebo TOR2p. TORC1 reguluje procesy aktivace transkripce a translace v závislosti na dostupnosti živin a je citlivý na působení rapamycinu. Rovněž TORC1 se podílí na regulaci procesu biogeneze ribosomů. Nejznámějšími a nejvíce prozkoumanými efektory TORC1 jsou fosfatáza Tap42p a kináza Sch9p. Převzato z (Ahn, Han, Lee, Lee, & Pai, 2011).

Správná regulace TORC1 je velice důležitá pro správné fungování organismů, neboť nežádoucí inaktivace nebo hyperaktivace TORC1 může vést k vážným poškozením buněk i organismů a často je příčinou vzniku nádorů (rev. (Laplane & Sabatini, 2013)), proto je tato dráha předmětem mnoha výzkumů. Je důležité se zabývat také regulátory TORC1, protože TORC1 dráha může selhávat i kvůli nesprávné regulaci. Například, mutace *NPRL2* genu, kódujícího Nprl2p, součást GATOR1 komplexu, byla nalezena v rakovinných buňkách plic a prsu (Lerman & Minna, 2000; J. Li et al., 2004).

2 Regulace TORC1.

2.1 EGO komplex („escape from growth arrest“)

EGO komplex hraje klíčovou roli v regulaci buněčného růstu a indukci autofagie (Dubouloz et al., 2005; B. Levine & Klionsky, 2004).

EGO komplex se podílí na regulaci TORC1 a skládá se z GTPáz Gtr1p a Gtr2p a Ego3p a Ego1p proteinů (Dubouloz et al., 2005). K složkám EGO komplexu patří i relativně nově objevený Ego2p, který napomáhá dimerizaci GTPáz Gtr1p a Gtr2p (T. P. Levine et al., 2013; Powis et al., 2015). Pro udržení funkčnosti a stability EGO komplexu je vyžadována souhra všech jeho složek.

Ego1p protein je klíčový pro skládání a stabilizaci celého EGO komplexu na vakuolární membráně. Kotví Ego2p a Ego3p proteiny, které se dále navzájem stabilizují (Kira et al., 2015). Ego1p též tvoří komplex s Gtr1p-Gtr2p GTPázami (Gao & Kaiser, 2006). Ego1p je asociován s vakuolární membránou. Důkazem je zjištění, že ztráta jedné z komponent EGO komplexu neovlivňuje lokalizaci ostatních jeho součástí, zatímco ztráta Ego1p vede k tomu, že část Gtr2p se vyskytuje v cytoplazmě a tudíž není přítomná na vakuolární membráně nejspíše proto, že není vázána na Ego proteiny (Dubouloz et al., 2005).

Ego2p protein je potřebný pro skládání EGO komplexu na vakuolární membráně. Je nutný pro zajištění stability Gtr1p-Gtr2p heterodimeru (Powis et al., 2015) a je přímou součástí EGO komplexu, zatímco Ego4p, nehledě na svoji strukturní podobnost s Ego2p proteinem (T. P. Levine et al., 2013) součástí EGO komplexu není, ale pravděpodobně se uplatňuje při interakcích s Gtr1p a Gtr2p GTPázami během jejich lokalizace na vakuolární membránu (Powis et al., 2015).

Buňky postrádající Ego2p nebo Ego4p protein stejně jako buňky postrádající jednu z Gtrp GTPáz nejsou schopné růst ani při nízkých koncentracích rapamycinu a nedokážou nastartovat růst po skončení jeho působení. Delece *EGO2* genu v kombinaci s delecí genu pro jednu z GTPáz (*GTR1* nebo *GTR2*) však nemá za následek zvýšení citlivosti k rapamycinu (Powis et al., 2015). Naopak, buňky postrádající pouze Ego4p rostou podobně jako rodičovské kmeny, což znamená, že Ego4p buď není pro EGO komplex esenciální a jeho funkce může být nahrazena jiným proteinem nebo součástí EGO komplexu vůbec není. Nadprodukce Ego2p

nebo Ego4p neovlivňuje aktivitu TORC1 komplexu. To, jestli je Ego2p protein pouze vázán na EGO komplex nebo je jeho přímou součástí, bylo zjišťováno na buňkách s delecí *EGO2* genu a nadprodukcí Gtr1p nebo Gtr2p GTPáz, a to Gtr1S20Lp (protein s nízkou afinitou k nukleotidům) a Gtr2Q66Lp (protein zablokovaný ve formě s navázaným GTP). Výsledky experimentů ukázaly, že Ego2p je součástí EGO komplexu a naznačily, že buď Ego2p reguluje EGO komplex přímo anebo jej ovlivňuje prostřednictvím jiného, dosud neidentifikovaného mechanismu (Powis et al., 2015).

Ego3p protein existuje ve formě homodimeru (Zhang et al., 2012) a tato dimerizace je zásadní pro asociaci s ostatními složkami EGO komplexu (Gtr1p a Gtr2p, Ego1p - (Dubouloz et al., 2005)) a lokalizaci na vakuolární membráně (Zhang et al., 2012). Homodimer Ego3p hraje zásadní role v regulaci TOR komplexu 1 přes EGO komplex, nicméně není jedinou složkou potřebnou pro skládání EGO a jeho lokalizaci na vakuolární membráně. Dimerizace Ego3p proteinu je tedy důležitá, ale není dostačující pro aktivaci TORC1 prostřednictvím EGO (Zhang et al., 2012). Unikátní konformace Ego3p homodimeru je nutná pro jeho vazbu na Ego1p. Alfa-helixy Ego3p homodimeru obsahují vazebné místo pro Gtr1p-Gtr2p, které je velmi důležité pro transport Gtrp GTPáz k Ego1p na vakuolární membráně. (Zhang et al., 2012)

Gtr2p, Ego1p a Ego3p jsou tedy lokalizovány na vakuolární membráně, přičemž Gtr2p je asociována s membránou výrazně slaběji než Ego1p a Ego3p proteiny. (Dubouloz et al., 2005)

Porovnání proteinových sekvencí ukazuje na vysoký stupeň konzervovanosti Ego3p proteinu, hlavně v místě alfa-helixu2, kde se uskutečňuje vazba Ego3p na Gtr1p-Gtr2p a forma homodimeru je vyžadována pro vazbu k vakuolárnímu kotvicímu proteinu Ego1p. (Zhang et al., 2012) Tudiž, Ego1p a Ego3p slouží jako membránové kotvy pro Gtr1p a Gtr2p. (Dubouloz et al., 2005)

Ortologem EGO komplexu v savčích buňkách je tzv. Ragulator komplex. Ragulator interaguje s Rag GTPázami a mTORC1, a všechny jeho komponenty jsou nezbytné pro spojení Rag GTPáz a mTORC1 na membráně lysosomu (Sancak et al., 2011). Ragulator je trimerní komplex skládající se z MP1p, p14, p18 proteinů. Tyto proteiny nemají sekvenční podobnost s Ego1p a Ego3p proteiny z EGO komplexu, ale mají podobnou funkci (Dubouloz et al., 2005; Sancak et al., 2011). Protein p18 plní funkci obdobnou Ego1p – kotví MP1p a p14 proteiny na povrchu lysosomu (tato funkce je závislá na přítomnosti lipidické kotvy na N konci p18), interaguje s Rag GTPázami a hraje roli tzv. „scaffold“ proteinu, který umožní správné propojení Rag GTPáz a MP1p a p14 proteinů (Nada et al., 2009; Sancak et al., 2011). Další úlohou Ragulator

komplexu při regulaci TORC1 je to, že propojuje (fyzicky i funkčně) Rag GTPázy a V-ATPázu, která se dále podílí na signalizaci o přítomnosti (dostatku) aminokyselin z lumen lysosomu na Rag GTPázy (viz dále) (Zoncu et al., 2011).

Gtr1p a Gtr2p jsou G proteiny patřící do rodiny Rag GTPas, které mají své homology v savčích buňkách. Jsou to Rag GTPázy, přičemž Rag A/B odpovídá Gtr1 GTPáze, Rag C/D – Gtr2p GTPáze (Hirose et al., 1998; Sekiguchi et al., 2001; Schürmann et al., 1995). Rag GTPázy a Gtr GTPázy jsou homologické, zatímco s nimi interagující proteiny v savčích a kvasinkových buňkách nesdílejí homologické sekvence. Ragulator a EGO komplexy regulují lokalizaci Rag i Gtr GTPáz, ale mechanismy ovlivnění mTORC1 a TORC1 vykazují určité rozdíly. (Gao & Kaiser, 2006; Sancak et al., 2011)

Gtr1p a Gtr2p GTPázy tvoří heterodimer, jehož aktivní formou je $Gtr1p^{GTP}$ - $Gtr2p^{GDP}$. $Gtr1p^{GTP}$ podjednotka je stabilní s výjimkou situací kdy na této podjednotce probíhá hydrolýza GTP za pomoci GAP proteinu (GTPase-activating protein) (Binda et al., 2009; Jeong et al., 2012). Naopak, $Gtr1p^{GDP}$ - $Gtr2p^{GTP}$ forma inhibuje TORC1 (Binda et al., 2009; Kim et al., 2008; Ma et al., 2016; Sancak et al., 2008; Valbuena et al., 2012).

Rag A/B a RagC/D také existují ve formě dimerů. V přítomnosti aminokyselin RagA/B vážou GTP za pomoci Ragulator komplexu, což dovoluje mTORC1 se přemístit na lysosomální membránu, a tak získat přístup k GTPáze Rheb, která následně aktivuje mTORC1. Ragulator funguje jako GEF („Guanine nucleotide Exchange Factor“) pro RagA/B GTPázy (Bar-Peled et al., 2013; Sancak et al., 2008). Rag A/B má v regulaci dominantní roli a reguluje mTORC1 neohledě na to, zda je na Rag C/D dimer je vázán GTP nebo GDP (Kim et al., 2008).

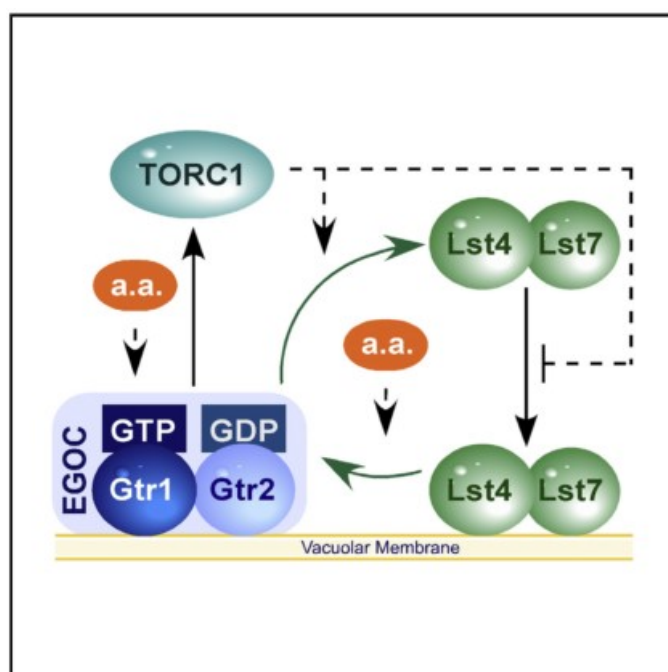
Gtr1p a Gtr2p GTPázy jsou tedy podobné Rag GTPázám, které se podílejí na pozitivní regulaci mTORC1 při odpovědi na přítomnost aminokyselin. Rag proteiny jsou na povrchu lysosomu přítomny nezávisle na dostupnosti aminokyselin (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008).

Jelikož ztráta Gtr2p, Ego1p nebo Ego3p proteinu má za následek zvýšení citlivosti TORC1 k rapamycinu a nadprodukce Gtr2p nebo Ego3p zvyšuje rezistenci k rapamycinu, celý EGO komplex je považován za velmi důležitou strukturu při regulaci odpovědi na působení rapamycinu (Dubouloz et al., 2005).

2.2 Lst4p a Lst7p proteiny

Lst4p a Lst7p proteiny tvoří heterodimer, který se podílí na regulaci TORC1. Komplex Lst4p-Lst7p ovlivňuje TORC1 přes podjednotku EGO komplexu – Gtr1p-Gtr2p heterodimer. Při nedostatku aminokyselin je Lst4p-Lst7p komplex nasměrován k vakuolární membráně, a nachází se v blízkosti Gtr1p-Gtr2p. Interaguje s Gtr-GTPázami až po stimulaci aminokyselinami. Tento komplex slouží jako GAP („GTPase activating protein“) pro Gtr2p, dále je z membrány uvolněn. Zajímavé je, že Rag GTPázy ovlivňují lokalizaci Lst4p-Lst7p komplexu na vakuolární membráně nezávisle na TOR komplexu 1.

Některé aminokyseliny, konkrétně glutamin, asparagin, kyselina asparagová, methionin a cystein, vykazují lepší schopnost aktivace TORC1 prostřednictvím Gtr2p, tj. jsou účinnější než ostatní aminokyseliny. Projevuje se to rychlejším uvolňováním Lst4p-Lst7p komplexu z vakuolární membrány (Péli-Gulli, Sardu, Panchaud, Raucci, & De Virgilio, 2015). Analogií Lst4p-Lst7p komplexu v savčích buňkách je komplex, který obsahuje FNIPp a folikulin a chová se obdobným způsobem. Zaujímá pozici na membráně lysosomu při nedostatku aminokyselin a je z ní uvolňován po stimulaci aminokyselinami (Petit et al., 2013; Tsun et al., 2005).



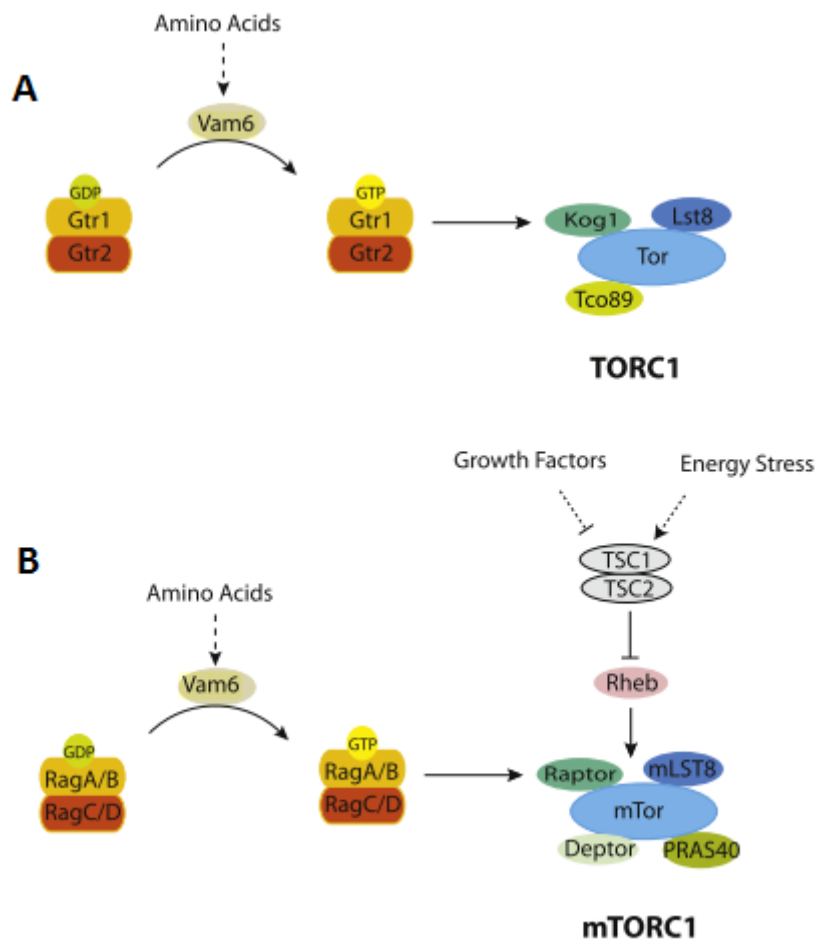
Obrázek 2.2. Schéma regulace TORC1 heterodimerem Lst4p-Lst7p v závislosti na přítomnosti aminokyselin. Převzato z (Péli-Gulli et al., 2015)

2.3 Vam6p

Vam6p protein se nachází na membráně vakuol společně s EGO a TORC1 komplexy a funguje jako GEF pro Gtr1p GTPázu – aktivuje ji a tím se podílí na regulaci aktivity TORC1. (Binda et al., 2009)

Homologem kvasinkového Vam6p je lidský hVam6p protein. Byly taky nalezeny jeho homology v buňkách *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* a *Schizosaccharomyces pombe*. Vam6p se mimo regulace TORC1 podílí na shlukování lysosomů (Caplan et al., 2001).

Vam6p vyskytující se v kvasinkách *S. pombe* se také podílí na regulaci buněčného růstu, není ale esenciálním proteinem pro signalizaci dostupnosti aminokyselin. Interakce mezi Vam6p a Gtr1p je však na dostupnosti aminokyselin závislá (Valbuena et al., 2012).

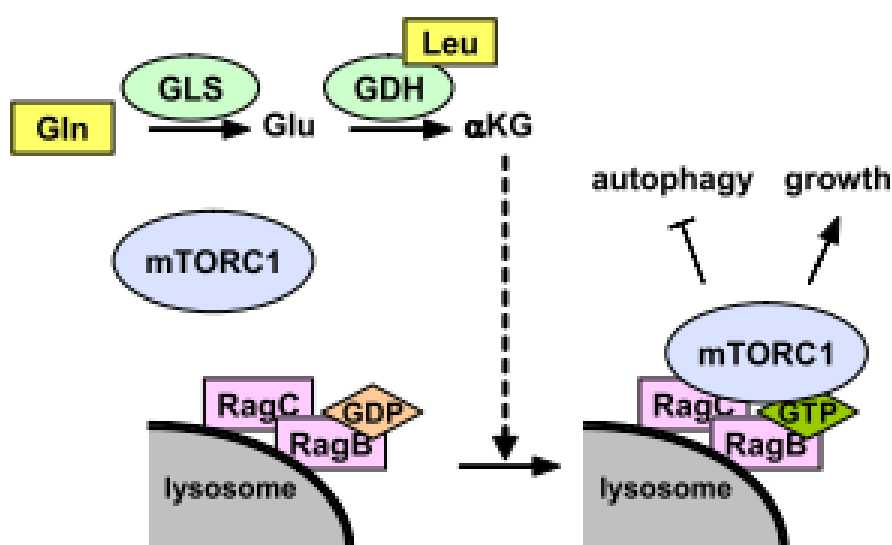


Obrázek 2.3. Schéma regulace TORC1 proteinem Vam6p v kvasinkových (A) a savčích (B) buňkách. Vam6p a hVam6p fungují jako GEF pro Gtr a Rag GTPázy. Převzato a upraveno z (L. Li & Guan, 2009)

2.4 Zdroje dusíku

Zdroje dusíku se podílejí na aktivaci TORC1 různým způsobem, podle toho, zda patří mezi tzv. preferované zdroje (např. amoniak a aminokyseliny glutamin, arginin a asparagin) nebo chudé zdroje (např. prolin). Zjednodušeně řečeno, tzv. preferované zdroje dusíku stimulují a udržují aktivitu TORC1, což má za následek i stimulaci růstu buněk. Rychlá a dočasná aktivace TORC1, která ale nepodporuje růst a buněčnou proliferaci, může být vyvolána jakýmkoliv zdrojem dusíku, preferované zdroje však aktivují TORC1 dlouhodobě a stimulují růstu a dělení buněk. Preferované zdroje dusíku stimulují TORC1 a podporují růst buněk nezávisle na EGO komplexu, kdežto jiné zdroje dusíku, např. leucin, aktivují TOR komplex přes komponenty EGO komplexu.

V kvasinkových buňkách syntéza a akumulace glutaminu způsobuje aktivaci TORC1. Glutamin, jako jeden z nejlepších zdrojů dusíku, se podílí na stimulaci TORC1 a je schopen aktivovat TORC1 i při velmi nízkých koncentracích (až 1%), tato aktivace však není dlouhodobá (Stracka et al., 2014).



Obrázek 2.4. Mechanismus aktivace mTORC1 alfa-ketoglutarátem vznikajícím při glutaminolýzi. Vysvětlení zkrátek: GLS – glutamináza, GDH – glutamát dehydrogenáza. Převzato z (Durán et al., 2012)

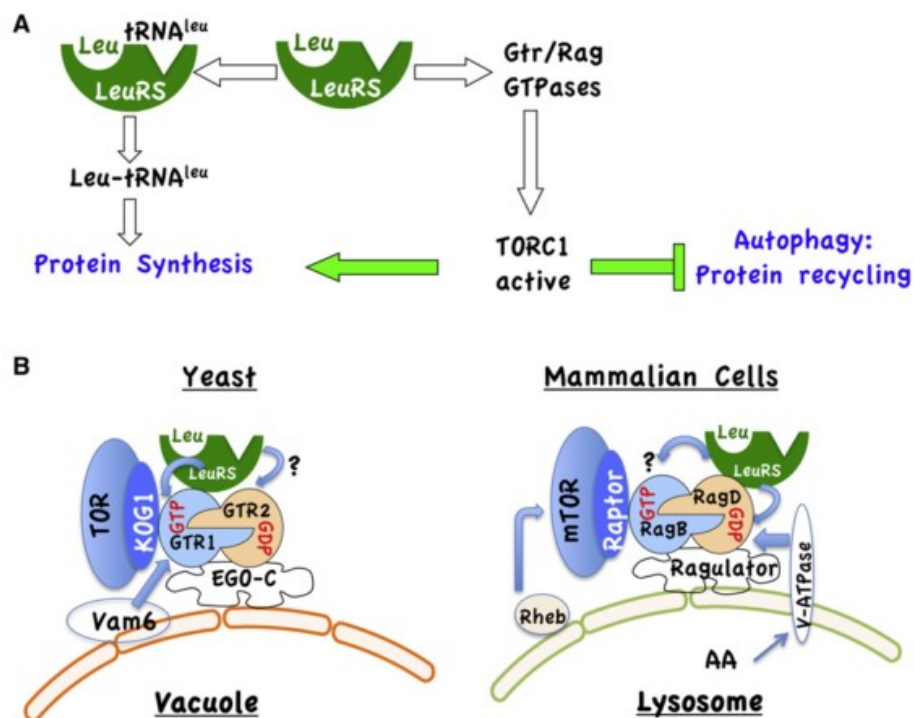
V savčích buňkách se aminokyseliny leucin a glutamin podílejí na aktivaci mTORC1 a podporují glutaminolýzu a tím i produkci alfa-ketoglutarátu, přičemž leucin samotný není schopen stimulovat mTORC1 a potřebuje k tomu přítomnost glutaminu. (Durán et al., 2012) Glutaminolýze, přesněji řečeno, při glutaminolýze vznikající alfa-ketoglutarát stimuluje vazbu GTP na RagB GTPázu. Tato vazba vede k aktivaci TORC1, neboť RagB^{GTP} zprostředkovává translokaci mTORC1 na povrch lysosomů a jeho následnou aktivaci. Dráha aktivace mTORC1 prostřednictvím alfa-ketoglutarátu nebo jí podobné zatím nejsou u kvasinek známy.

V živočišných buňkách v důsledku aktivace mTORC1 prostřednictvím leucinu a glutaminu dochází k inhibici na mTORC1 závislé autofagie. (Durán et al., 2012)

2.5 LeuRS (Leucyl-tRNA syntetáza)

Jedním z významných aktivátorů TORC1 je leucin (Avruch et al., 2009), který se účastní leucin-závislé signalizace prostřednictvím interakce LeuRS (leucyl-tRNA-syntetáza) Cdc60p s Gtr1p, a tím TORC1 poskytuje informaci o dostupnosti leucinu (Bonfils et al., 2012). Enzym LeuRS, neboli leucyl-tRNA-syntetáza vykazuje dvě funkčně odlišné aktivity – tRNA-leucyl-acylační a aminoacyl-proofreading aktivitu (rozpoznává a hydrolyzuje nesprávně zařazené leucyl-tRNA molekuly) (Ling, Reynolds, & Ibba, 2009). Leucyl-acylační aktivita neovlivňuje TORC1, a to ani v buňkách kvasinek *S. cerevisiae* (Bonfils et al., 2012), ani v buňkách savčích, což bylo ukázáno např. na CHO buňkách („Chinese hamster ovary cells“) (Wang et al., 2008).

Proofreading funkce LeuRS a nenabitá tRNA se podílejí na regulaci TORC1 (Bonfils et al., 2012). LeuRS interaguje s Gtr1p GTPázou, která je součástí EGO komplexu a zprostředkovává udržení Gtr1p^{GTP} stavu, který je požadován pro aktivaci TORC1 (Dubouloz et al., 2005). Tato interakce probíhá v přítomnosti leucinu. Interakce LeuRS a Gtr1p je uskutečněna přes CP1 doménu Leucyl-tRNA syntetázy (Bonfils et al., 2012). Gtr1p také interaguje s KOG1p proteinem, který je součástí TORC1 (Binda et al., 2009).

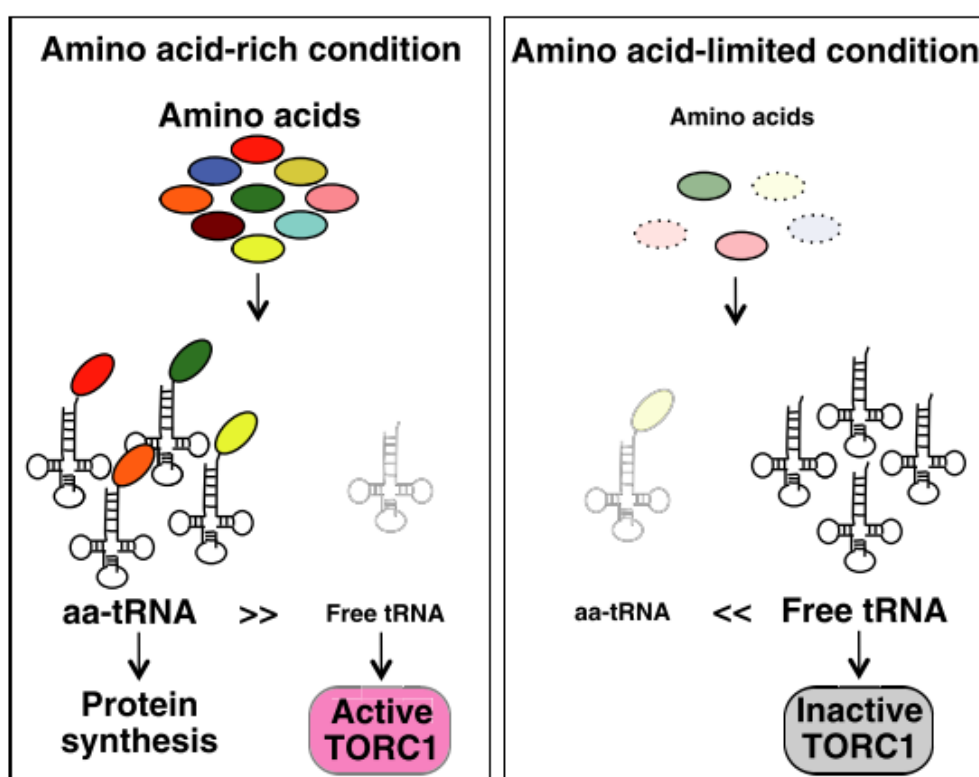


Obrázek 2.5. A – při vazbě leucinu na LeuRSp dochází k interakci LeuRSp a Gtr nebo Rag GTPázy a k aktivaci TORC1, aktivovaný TORC1 dále stimuluje proteosyntézu a je potlačena autofagie. Tento proces probíhá v kvasinkových a savčích buňkách. B – porovnání aktivace TORC1 pomocí LeuRSp u kvasinek a savců. V případě kvasinek k aktivaci TORC1 prostřednictvím LeuRSp dochází díky interakci mezi LeuRSp a Gtr1^{GTP} GTPázou. V savčích buňkách LeuRSp funguje jako GAP pro RagDp GTPázu. Zatím není známo, zda v kvasinkových buňkách LeuRSp je GAP pro Gtr2p a jestli v savčích buňkách LeuRSp nějakým způsobem brání hydrolýze na RagBp vázaného GTP. Převzato z (Segev & Hay, 2012)

Při zařazení nesprávné tRNA se aktivuje proofreading funkce LeuRSp. Aby mohla LeuRSp opravit nesprávně zařazenou tRNA, musí dojít ke konformační změně její CP1 domény, což má za následek přerušení interakce mezi LeuRSp a Gtr1p a zároveň k hydrolýze GTP Gtr1p GTPázou, což způsobuje inhibici TORC1.

2.6 tRNA (Transfer RNA)

Aminokyseliny jsou v buňkách metabolicky zpracovány za vzniku aminoacyl-tRNA pro následující syntézu proteinů. Tato reakce je katalyzována aminoacyl-tRNA syntetázou (aaRS)(Foltan, 2008). Testováním teplotně-citlivých mutantů LeuRSp, HisRSp, IleRSp při nepermissivních teplotních podmínkách a zároveň při dostatečném množství dusíku byl zjištěn pokles aktivity TORC1, což dovoluje předpokládat, že pro regulaci TORC1 jsou důležité právě aaRS nebo produkty vznikající jejich činnosti a nikoliv aminokyseliny samotné. Dále pak, že se na regulaci aktivity TORC1 podílí nejen LeuRS, ale i další aminoacyl-tRNA syntetázy (Kamada, 2017).

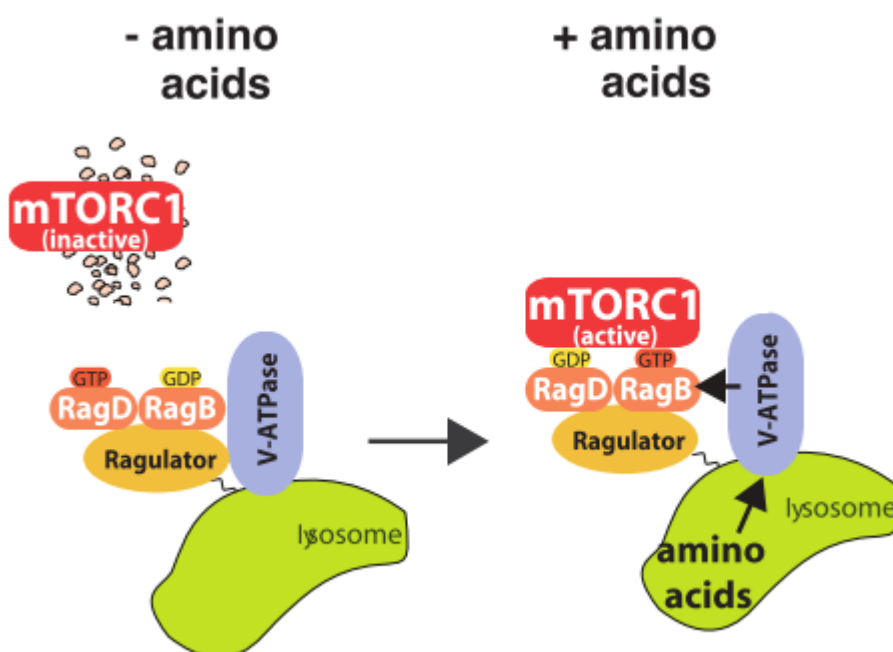


Obrázek 2.6. Schéma regulace TORC1 pomocí molekul tRNA. V podmínkách dostatku aminokyselin je většina tRNA nabitá aminokyselinami a je podporována proteosyntéza. TORC1 zůstává aktivní. V případě že buňka postrádá aminokyseliny, dochází k nahromadění volných tRNA, které mohou interagovat s TORC1 a inhibovat ho. Převzato z (Kamada, 2017).

V přítomnosti aminokyselin dochází ke vzniku aminoacyl-tRNA molekul pro následující syntézu proteinů a nezařazené tRNA se podílejí na aktivaci TORC1. Naproti tomu, v nepřítomnosti aminokyselin dochází k nahromadění volných transferových RNA molekul v buňce a dochází k inaktivaci TORC1.

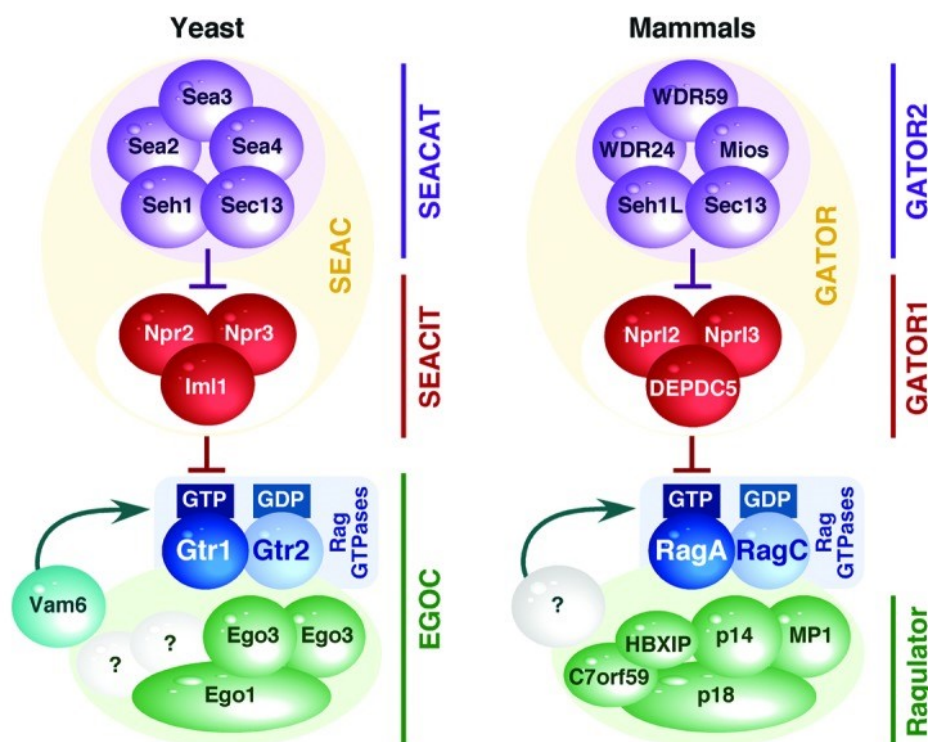
2.7 V-ATPáza

V buňkách vyšších eukaryot hraje roli v regulaci mTORC1 prostřednictvím aminokyselin také H^+ -adenosin trifosfát ATPáza (dale V-ATPáza). Bylo prokázáno, že signální dráha regulace TORC1 prostřednictvím aminokyselin začíná již v lysosomu. Nezbytnou součástí této regulace je V-ATPáza, která na lysosomální membráně interaguje s Ragulator komplexem dvěma doménami (V0 a V1) a jednou doménou (V1) s Rag GTPázami. Hydrolyza ATP a s ní spojená rotace V-ATPázy jsou nezbytné pro přenos signálu (z lumen lysozomu na Rag GTPázy). Po nahromadění aminokyselin v lumen lysosomu dochází k přenosu signálu na Rag GTPázy prostřednictvím interakce V-ATPázy a Ragulatoru, stav Rag GTPáz se mění z neaktivního $RagD^{GTP}-RagB^{GDP}$ na aktivní $RagD^{GDP}-RagB^{GTP}$, což vede k navázání TORC1 na Rag GTPázy na povrchu lysosomu (Zoncu et al., 2011).



Obrázek 2.7. Schéma regulace mTORC1 prostřednictvím V-ATPázy v závislosti na přítomnosti aminokyselin. V nepřítomnosti aminokyselin zůstává mTORC1 neaktivní a je lokalizován volně v cytoplasmě. Při vysokých koncentracích aminokyselin v lumen lysosomu dochází k přenosu signálu z lumen lysosomu na Rag GTPázy prostřednictvím interakce V-ATPázy s Ragulátorem a následně k nasměrování TORC1 k lysosomální membráně, kde je aktivován. Převzato z (Zoncu et al., 2011)

2.8 SEA komplex a GATOR komplex.



Obrázek 2.8. Schéma regulace TORC1 prostřednictvím SEA komplexu a regulace mTORC1 prostřednictvím GATOR komplexu. Převzato z (Panchaud et al., 2013)

2.8.1 SEA komplex („Seh1-associated complex“)

SEA komplex se podílí na regulaci TORC1 ovlivněním EGO komplexu. Skládá se z Sea1p–Sea4p, Seh1p, Sec13p, Npr2p and Npr3p, přičemž název Sea1p se používá pro označení Iml1p. (Dokudovskaya et al., 2011)(Dokudovskaya et al., 2011)(Dokudovskaya et al., 2011). SEA komplex je evolučně konzervovaný komplex, který se vyskytuje v buňkách nižších a vyšších eukaryot. Sea proteiny jsou asociovány s vakuolární membránou, ale nejsou do ní integrovány – jsou to periferní membránové proteiny. Vykazují dynamické chování a skládají se do větších proteinových komplexů (Dokudovskaya et al., 2011).

Proteiny SEA komplexu tvoří dva subkomplexy - SEACIT a SEACAT (Panchaud, Péli-Gulli, & De Virgilio, 2013) (Bar-Peled, Chantranupong, et al., 2013). Tyto dva subkomplexy jsou strukturně odlišné ale funkčně propojené (Algret et al., 2014). SEACIT komplex neboli „SEA

complex inhibiting TORC1“ se skládá z Sea1p, Npr3p, a Npr2p proteinů. Součástí SEACAT komplexu neboli „SEA complex activating TORC1“ jsou Sea2p, Sea3p, Sea4p, Seh1p, a Sec13p proteiny (Algret et al., 2014).

2.8.2 SEACIT („SEA complex inhibiting TORC1“)

SEACIT komplex se podílí na inhibici TORC1 (Algret et al., 2014). Jak již bylo uvedeno, SEACIT se skládá ze tří proteinů, a to Npr2p, Npr3p a Iml1p (alias Sea1p) (viz.předchozí odstavec). Npr2p a Npr3p jsou navzájem interagující regulátory TORC1, které společně s Iml1p tvoří vysoce konzervovaný komplex SEACIT (Neklesa & Davis, 2009) (Wu & Tu, 2011). V nepřítomnosti Npr2p a Npr3p dochází k hyperaktivaci TORC1 a tím je inhibována autofagie, což znamená že se Npr2p a Npr3p podílejí na inhibici TORC1 a prostřednictvím TORC1 tak regulují autofagii (Dokudovskaya et al., 2011) (Wu & Tu, 2011). Buňky postrádající Npr2p protein vykazují metabolické změny i v podmínkách nedostatku zdroje dusíku. Namísto indukce autofagie byla pozorována indukce proliferace (Laxman, Sutter, Shi, & Tu, 2014). Ztráta Iml1p proteinu, který je součástí SEACIT komplexu (Wu & Tu, 2011) má také za následek aktivaci TORC1 (Panchaud et al., 2013).

Iml1p, Npr2p a Npr3p podporují indukci autofagie a také se podílejí na zachování integrity vakuol. Celistvost vakuol je děj úzce spojený se zvyšováním efektivity autofagie – uvádí se, že při inhibici TORC1 rapamycinem nebo při nedostatku živin, kdy je aktivována autofagie, mají vakuoly tendenci splývat (fúzovat) do větších útvarů pro usnadnění procesu degradace (Michaillat, Baars, & Mayer, 2012)(Algret et al., 2014).

Iml1p je nutný pro správné umístění SEA komplexu na vakuolární membráně. Nevyžaduje ostatní složky komplexu, zatímco Npr2p a Npr3p jsou na sobě závislé a také jsou závislé na Iml1p, díky kterému mohou být na membráně lokalizovány (Panchaud, Péli-Gulli, & De Virgilio, 2013). Pro lokalizaci Iml1p na vakuolární membráně je ale požadován EGO komplex. Iml1p protein se podílí na regulaci TORC1 přes EGO a to tak, že funguje jako GAP pro Gtr1p, která je součástí EGO komplexu (Panchaud, Péli-Gulli, & De Virgilio, 2013).

SEACIT podporuje hydrolytickou aktivitu Gtr1p a tím se podílí na inhibici TORC1 přes EGO komplex.

2.8.3 SEACAT („SEA complex activating TORC“)

Komplex SEACAT se skládá z Sea2p, Sea3p, Sea4p, Seh1p, a Sec13p proteinů (viz.výše). SEACAT (savčí GATOR2) subkomplex se podílí na regulaci SEACIT (savčí GATOR1) subkomplexu. Sec13p a Seh1p se společně s ostatními komponentami SEACAT komplexu podílejí na aktivaci TORC1 tím, že inhibují funkci GAP SEACIT komplexu (Panchaud, Péli-Gulli, & Virgilio, 2013). Ztráta Seh1p vede k značnému snížení aktivity TORC1.

Zajímavé je, že Sec13p a Seh1p proteiny také hrají roli v transportu makromolekul přes komplex jaderného póru (NPC; „nuclear pore complex“) a poruchy funkce NPC nebo sekrece proteinů mohou bránit Seh1p a nebo Sec13p v jejich funkci a tak snižovat účinnost skládání SEA komplexu a způsobovat inhibici TORC1(Panchaud, Péli-Gulli, & Virgilio, 2013) (rev. (Hoelz, Debler, & Blobel, 2011)).

2.8.4 GATOR („GAP Activity Towards Rags“)

V živočišných buňkách je přítomen GATOR komplex, který je homologický SEA komplexu v buňkách kvasinkových. Tento komplex se skládá ze dvou podjednotek, a to GATOR1 (DEPDC5p, Npr12p a Npr13p) a GATOR2 (Miosp, WDR24p, WDR59p, Seh1Lp a Sec13p). GATOR1 zprostředkovává interakci GATOR komplexu s Rag GTPázami (je GAP pro RagA/B) a tak se podílí na inhibici TORC1, zatímco GATOR2 komplex reguluje TORC1 přes GATOR1, a konkrétně aktivuje TORC1 inhibicí GATOR1 (Bar-Peled, Chantranupong, et al., 2013).

2.9 Lam2p

Lam2p protein je homologem součástí Ragulator komplexu LAMTOR2. Lam2p je negativním regulátorem TORC1 aktivity a funguje podobně jako Npr2p a Npr3p, alespoň v podmínkách, kdy je omezená dodávka dusíku. Spolu s Npr2p-Npr3p se podílí na navádění Gtr1p-Gtr2p k vakuolární membráně a na udržení určité hladiny proteinů Gtr1p-Gtr2p. Lam2p tvoří komplex s Gtr1p a Npr2p, tím se asi uskutečňuje navedení Gtr1p s navázaným GDP k vakuolární membráně, a tak dochází k negativní regulaci TORC1 (Ma et al., 2016).

3 Závěr.

Cílem této práce byl popis regulátorů TOR komplexu 1 u kvasinek a ve vybraných případech porovnání regulace TORC1 a homologního komplexu v savčích buňkách mTORC1.

Regulace těchto komplexů u kvasinek i u savčích buněk je v současné době předmětem mnohých výzkumů. TORC1 je proteinový komplex který je zodpovědný za regulaci buněčné proliferace, proteosyntézy, metabolismu a autofagie. Správná aktivace nebo inhibice daného komplexu je vyžadována pro správné fungování organismů. Některé mechanismy regulace TORC1 jsou konzervovány, např. EGO a SEA komplexy v kvasinkách mají svoje homology v savčích buňkách, které se rovněž uplatňují v regulaci mTORC1. Narušení funkce nejen TORC1, ale i struktur, které ho ovlivňují, může mít za následek poškození buněk nebo celého organismu. Poškození nebo nepřítomnost nejen celých proteinových komplexů, regulujících TORC1, ale i jejich součástí, vede k selhání regulace TORC1.

Kvasinky, ve kterých řada regulací probíhá podobně jako v savčích buňkách, jsou výborný modelový organismus pro studium konzervovaných signálních mechanismů, jako je TORC1 dráha. Pochopení funkce TORC1 a jeho regulátorů u kvasinek pak může přispět k lepšímu pochopení a odhalení nových mechanismů uplatňujících se při funkcích tohoto komplexu u savčích buněk, což může v důsledku pomoci navrhnout způsoby a metody léčby nemocí, jejichž příčinou je porucha regulace TORC1.

4 Literatura

- Ahn, C. S., Han, J.-A., Lee, H.-S., Lee, S., & Pai, H.-S. (2011). The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *The Plant Cell*, 23(1), 185–209. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074005>
- Algret, R., Fernandez-Martinez, J., Shi, Y., Kim, S. J., Pellarin, R., Cimerancic, P., ... Dokudovskaya, S. (2014). Molecular architecture and function of the SEA complex, a modulator of the TORC1 pathway. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 13(11), 2855–70. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.039388>
- Avruch, J., Long, X., Ortiz-Vega, S., Rapley, J., Papageorgiou, A., & Dai, N. (2009). Amino acid regulation of TOR complex 1. *American Journal of ...*, 1(98), 592–602. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90645.2008>.
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A. D., Chen, W. W., Ottina, K. A., Grabiner, B. C., ... Sabatini, D. M. (2013). A tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *October*, 454(1), 42–54. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3182540562>.The
- Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R., & Sabatini, D. M. (2013). An expanded Ragulator is a GEF for the Rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1, 150(6), 1196–1208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.032>.An
- Binda, M., Péli-Gulli, M. P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T. W., ... De Virgilio, C. (2009). The Vam6 GEF Controls TORC1 by Activating the EGO Complex. *Molecular Cell*, 35(5), 563–573. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.033>
- Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., & De Virgilio, C. (2012). Leucyl-tRNA Synthetase Controls TORC1 via the EGO Complex. *Molecular Cell*, 46(1), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.009>
- Caplan, S., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Naslavsky, N., & Bonifacino, J. S. (2001). Human Vam6p promotes lysosome clustering and fusion in vivo. *Journal of Cell Biology*, 154(1), 109–121. <https://doi.org/10.1083/jcb.200102142>
- Dokudovskaya, S., Waharte, F., Schlessinger, A., Pieper, U., Devos, D. P., Cristea, I. M., ... Dargemont, C. (2011). A conserved coatomer-related complex containing Sec13 and

- Seh1 dynamically associates with the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 10(6), 1–17. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.006478>
- Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., & De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.020>
- Durán, R. V., Oppliger, W., Robitaille, A. M., Heiserich, L., Skendaj, R., Gottlieb, E., & Hall, M. N. (2012). Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. *Molecular Cell*, 47(3), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.043>
- Foltan, J. S. (2008). tRNA genes and the genetic code. *Journal of Theoretical Biology*, 253(3), 469–482. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.03.006>
- Gao, M., & Kaiser, C. A. (2006). A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 16(7), 609–625. <https://doi.org/10.1091/mbc>
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K. ichi, Oshiro, N., Hidayat, S., ... Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110(2), 177–189. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00833-4)
- Heitman, J., Movva, N. R., & Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253(5022), 905–909. <https://doi.org/10.1126/science.1715094>
- Hirose, E., Nakashima, N., Sekiguchi, T., & Nishimoto, T. (1998). RagA is a functional homologue of *S. cerevisiae* Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. *Journal of Cell Science*, 111(Pt 1), 11–21.
- Hoelz, A., Debler, E. W., & Blobel, G. (2011). The Structure of the Nuclear Pore Complex. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 613–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060109-151030>
- Jeong, J. H., Lee, K. H., Kim, Y. M., Kim, D. H., Oh, B. H., & Kim, Y. G. (2012). Crystal structure of the Gtr1pGTP-Gtr2pGDP protein complex reveals large structural rearrangements triggered by GTP-to-GDP conversion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 29648–29653. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.384420>

- Kamada, Y. (2017). Novel tRNA function in amino acid sensing of yeast Tor complex1. *Genes to Cells*, 22, 135–147. <https://doi.org/10.1111/gtc.12462>
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., & Guan, K.-L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response Eunjung. *Nature Cell Biology*, 10(8), 935–945. <https://doi.org/10.1038/ncb1753>. Regulation
- Kira, S., Kumano, Y., Ukai, H., Takeda, E., Matsuura, A., & Noda, T. (2015). Dynamic relocation of the TORC1–Gtr1/2–Ego1/2/3 complex is regulated by Gtr1 and Gtr2 Shintaro. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0470>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2013). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>. mTOR
- Laxman, S., Sutter, B. M., Shi, L., & Tu, B. P. (2014). Npr2 regulates cellular utilization of glutamine for biosynthesis of nitrogen-containing metabolites through TORC1. *Sci Signal*, 33(4), 395–401. <https://doi.org/10.1038/nbt.3121>. ChIP-nexus
- Lerman, M., & Minna, J. D. (2000). The 630-kb Lung Cancer Homozygous Deletion Region on Human Chromosome 3p21 . 3 : Identification and Evaluation of the Resident Candidate Tumor Suppressor Genes 1. *Cancer Research*, 60, 6116–6133.
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, 6(4), 463–477. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00099-1)
- Levine, T. P., Daniels, R. D., Wong, L. H., Gatta, A. T., Gerondopoulos, A., & Barr, F. a. (2013). Discovery of new Longin and Roadblock domains that form platforms for small GTPases in Ragulator and TRAPP-II. *Small GTPases*, 4(2), 62–9. <https://doi.org/10.4161/sgtp.24262>
- Li, J., Wang, F., Haraldson, K., Protopopov, A., Duh, F. M., Geil, L., ... Zabarovsky, E. R. (2004). Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C. *Cancer Research*, 64(18), 6438–6443. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3869>
- Li, L., & Guan, K. L. (2009). Amino Acid Signaling to TOR Activation: Vam6 Functioning as a Gtr1 GEF. *Molecular Cell*, 35(5), 543–545.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.010>

Ling, J., Reynolds, N., & Ibba, M. (2009). Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control. *Annual Review of Microbiology*, 63, 61–78.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073210>

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., ... Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*, 10(3), 457–468.

[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00636-6)

Ma, N., Ma, Y., Nakashima, A., Kikkawa, U., & Furuyashiki, T. (2016). The loss of Lam2 and Npr2-Npr3 diminishes the vacuolar localization of Gtr1-Gtr2 and disinhibits TORC1 activity in fission yeast. *PLoS ONE*, 11(5), 1–22.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156239>

Michaillat, L., Baars, T. L., & Mayer, A. (2012). Cell-free reconstitution of vacuole membrane fragmentation reveals regulation of vacuole size and number by TORC1. *Molecular Biology of the Cell*, 23(5), 881–95. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-08-0703>

Nada, S., Hondo, A., Kasai, A., Koike, M., Saito, K., Uchiyama, Y., & Okada, M. (2009). The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK–ERK pathway to late endosomes. *Embo*, 28(5), 477–489.

<https://doi.org/10.1038/emboj.2008.308>

Neklesa, T. K., & Davis, R. W. (2009). A genome-wide screen for regulators of TORC1 in response to amino acid starvation reveals a conserved Npr2/3 complex. *PLoS Genetics*, 5(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000515>

Panchaud, N., Péli-Gulli, M.-P., & De Virgilio, C. (2013). Amino acid deprivation inhibits TORC1 through a GTPase-activating protein complex for the Rag family GTPase Gtr1. *Science Signaling*, 6(277), 1–7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004112>

Panchaud, N., Péli-Gulli, M.-P., & Virgilio, C. De. (2013). SEACing the GAP that nEGOCiates TORC1 activation. *Cell Cycle*, 12(18). <https://doi.org/10.4161/cc.26000>

Péli-Gulli, M. P., Sardu, A., Panchaud, N., Raucci, S., & De Virgilio, C. (2015). Amino Acids Stimulate TORC1 through Lst4-Lst7, a GTPase-Activating Protein Complex for the Rag

- Family GTPase Gtr2. *Cell Reports*, 13(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.059>
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, M., ... Sabatini, D. M. (2009). 4 NF- κ B Signaling in Skeletal Muscle Health and Disease. *Current Topics in ...*, 137(5), 873–886.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>.DEPTOR
- Petit, C. S., Roczniak-Ferguson, A., & Ferguson, S. M. (2013). Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of rag gtpases. *Journal of Cell Biology*, 202(7), 1107–1122. <https://doi.org/10.1083/jcb.201307084>
- Powis, K., Zhang, T., Panchaud, N., Wang, R., De Virgilio, C., & Ding, J. (2015). Crystal structure of the Ego1-Ego2-Ego3 complex and its role in promoting Rag GTPase-dependent TORC1 signaling. *Cell Research*, 25(9), 1043–59.
<https://doi.org/10.1038/cr.2015.86>
- Sancak, Y., Bar-peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., & Sabatini, D. M. (2011). NIH Public Access. *Cell*, 141(2), 290–303.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.024>.Ragulator-Rag
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. a, Thoreen, C. C., Bar-peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882), 1496–1501.
<https://doi.org/10.1126/science.1157535>.The
- Segev, N., & Hay, N. (2012). Hijacking Leucyl-tRNA Synthetase for Amino Acid-Dependent Regulation of TORC1. *Molecular Cell*, 46(1), 4–6.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.028>
- Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Ii, M., & Nishimoto, T. (2001). Novel G Proteins, Rag C and Rag D, Interact with GTP-binding Proteins, Rag A and Rag B. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7246–7257. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004389200>
- Schürmann, A., Brauers, A., Maßmann, S., Becker, W., & Joost, H. G. (1995). Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras-related GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28982–28988. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28982>

- Stracka, D., Jozefczuk, S., Rudroff, F., Sauer, U., & Hall, M. N. (2014). Nitrogen source activates TOR (Target of Rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 289(36), 25010–25020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574335>
- Tsun, Z.-Y., Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Zoncu, R., Wang, T., Kim, C., ... Sabatini, D. M. (2005). The Folliculin tumor suppressor is a GAP for RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Biophysical Chemistry*, 257(5), 2432–2437. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>. Two-stage
- Valbuena, N., Guan, K.-L., & Moreno, S. (2012). The Vam6 and Gtr1-Gtr2 pathway activates TORC1 in response to amino acids in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 125(8), 1920–1928. <https://doi.org/10.1242/jcs.094219>
- Wang, X., Fonseca, B. D., Tang, H., Liu, R., Elia, A., Clemens, M. J., ... Proud, C. G. (2008). Re-evaluating the roles of proposed modulators of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30482–30492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803348200>
- Wu, X., & Tu, B. P. (2011). Selective regulation of autophagy by the Iml1-Npr2-Npr3 complex in the absence of nitrogen starvation. *Molecular Biology of the Cell*, 22(21), 4124–4133. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0525>
- Zhang, T., Péli-Gulli, M. P., Yang, H., De Virgilio, C., & Ding, J. (2012). Ego3 functions as a homodimer to mediate the interaction between Gtr1-Gtr2 and Ego1 in the EGO complex to activate TORC1. *Structure*, 20(12), 2151–2160. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.09.019>
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., & Sabatini, D. M. (2011). mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H⁺-ATPase Roberto Zoncu. *Science (New York, N.Y.)*, 678(2011), 678–83. <https://doi.org/10.1126/science.1207056>